一株新的致倦库蚊细胞系的建立与鉴定

罗 岚, 崔 峰*

(中国科学院动物研究所, 农业虫害鼠害综合治理研究国家重点实验室, 北京 100101)

摘要:【目的】以致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 初孵幼虫组织为材料建立细胞系并对其进行分子鉴定。【方法】将实验室筛选的对硫磷抗性的致倦库蚊深桂品系的初孵幼虫剪碎后放入添加20%胎牛血清的改良 M199 培养基原代培养,并对原代细胞用胰蛋白酶传代培养成细胞系;通过显微镜观察其生物学特性以及 DNA 扩增指纹图谱和内转录间隔区序列鉴定其组织来源。【结果】该细胞系 Cxq-1 在 M199 完全培养基中生长良好,已成功传代培养 12 个月,并于液氮中冻存,并多次成功复苏。通过 DNA 扩增指纹图谱鉴定,Cxq-1 与实验室培养的其他昆虫细胞 DNA 指纹图谱的条带各异,表明确为同源昆虫致倦库蚊细胞系。通过内转录间隔区序列测定技术鉴定,Cxq-1 的 rDNA-ITS1 和 rDNA-ITS2 序列与 GenBank 中致倦库蚊相应核酸序列的一致性大于 99%,表明其来源组织确为致倦库蚊。【结论】新建立的蚊初孵幼虫细胞系 Cxq-1 确为致倦库蚊细胞系。该细胞系为实验室今后开展杀虫剂抗性分子机制、蚊媒病毒、寄生虫等研究提供了重要平台。

关键词: 致倦库蚊; 细胞系; DNA 扩增指纹图谱; 内转录间隔区; 分子鉴定

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2018)01-0079-07

Establishment and identification of a new cell line from *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae)

LUO Lan, CUI Feng* (State Key Laboratory of Integrated Management of Pest Insects and Rodents, Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract:【Aim】This study aims to establish and molecularly identify a cell line based on tissues from the newly hatched larvae of the mosquito *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).【Methods】The shredded tissues of the newly hatched larvae of the parathion-resistant strain Shengui of *C. pipens quinquefasciatus* were cultured in M199 complete medium supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum, and the primary cells were obtained. The primary cells were treated with trypsin and subcultured into a cell line. The tissue origin of the cell line was identified by observing its biological characteristics under a microscope and comparing DNA amplification fingerprinting and sequencing the ribosome DNA internal transcribed spacer.【Results】The cell line Cxq-1 was well maintained in M199 complete medium and subcultured continually for 12 months. After being frozen in liquid nitrogen, Cxq-1 was successfully resuscitated for several times. DNA amplification fingerprinting polymerase chain reaction clearly distinguished Cxq-1 from two other insect cell lines. Sequencing of ribosome DNA internal transcribed spacer of Cxq-1 indicated that its rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2 sequences has higher than 99% identity with those of *C. pipens quinquefasciatus* registered in the GenBank, confirming the origin of Cxq-1.【Conclusion】The newly established cell line Cxq-1 from

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFC1201004); 中国科学院学科发展战略研究(2015-SM-C-02)
作者简介: 罗岚, 女, 1982 年 1 月生, 江西丰城人, 硕士, 工程师, 研究方向为昆虫细胞与昆虫电生理, E-mail: luolan@ioz.ac.cn
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: cuif@ioz.ac.cn
收稿日期 Received: 2017-06-23; 接受日期 Accepted: 2017-11-06

newly hatched larvae of *C. pipens quinquefasciatus* has been confirmed to be a cell line of this mosquito. This cell line provides an important platform for studying the molecular mechanisms of insecticide resistance, mosquito-borne viruses and parasites in the future.

Key words: *Culex pipiens quinquefasciatus*; cell line; DNA amplification fingerprinting; internal transcribed spacer; molecular identification

致倦库蚊 *Culex pipiens quinquefasciatus* 属于库蚊属 *Culex* 库蚊亚属尖音库蚊复合组 *C. pipiens* complex 的成员,主要分布于我国的南方地区及南方岛屿如台湾岛和海南岛(宋社吾等, 2003)。尖音库蚊复合组是我国斑氏丝虫病的主要传播媒介,还能传播乙型脑炎。在国外该复合组与多种虫媒病毒的传播有关,是圣路易脑炎病毒(St Louis encephalitis virus)、西尼罗病毒(West Nile virus)、辛德毕斯(Sindbis virus)和裂谷热病毒(Rift Valley fever viruses)的重要媒介(Turell, 2012)。

自 1966 年 Grace 成功建立埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 末龄幼虫细胞系以来(Grace, 1966),包括按蚊 *Anopheles*、库蚊 *Culex* 和伊蚊 *Aedes* 在内的各种主要蚊媒病毒的媒介蚊种细胞系不断被建立。我国蚊细胞系的成功建立开始于 1980 年,潘李珍等建立了白纹伊蚊的初孵幼虫细胞系(潘李珍等, 1980)。据不完全统计,至今为止国内外已有超过 20 个蚊种 50 多株蚊细胞系成功建立(Oelofsen *et al*., 1990; 蓝明扬和赵郁光, 1991; Charpentier *et al*., 1995; Bello *et al*., 1997; Sudeep *et al*., 2009; Kuwata *et al*., 2012; Segura *et al*., 2012; Hoshino *et al*., 2015)。

作为亚洲乙脑病毒(Japanese encephalitis virus)主要虫媒的库蚊,Kitamura(1970)和 Hsu 等(1970)利用成虫的卵巢分别成功建立骚扰库蚊 *Culex pipiens molestus* 和致倦库蚊细胞系; Hsu 等(1972)利用成虫卵巢和颜林等(1989)利用初孵幼虫建成三带喙库蚊 *Culex tritaeniorhynchus* 细胞系;Athawale 等(2002)和 Kuwata 等(2012)分别用胚胎建成三带喙库蚊细胞系,其中 Kuwata 等建立的细胞系 NIID-CTR 为乙型脑炎病毒和登革病毒高度易感细胞系,是研究病毒在宿主体内复制机制的重要模型(Walker *et al*., 2014);Segura 等(2012)利用致倦库蚊胚胎建立了一株新的致倦库蚊细胞系。而有关利用致倦库蚊初孵幼虫建立细胞系的相关研究,国内外还未报道。本研究利用致倦库蚊初孵幼虫建立了一株新的细胞系,实现了传代培养,并对其进行了分子鉴定,为未来利用该细胞系进行致倦库蚊生物学研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试蚊虫及其饲养

致倦库蚊 Slab 品系由法国科学与进化研究 Raymond 教授惠赠,是杀虫剂敏感品系。致倦库蚊深桂品系于 2007 年采自广东佛山(23°03′N,113°06′E),是实验室有机磷杀虫剂多代筛选后的对硫磷的抗性品系,其 3 龄幼虫对硫磷抗性为 Slab 品系的 115 倍。参考蓝明扬和赵郁光(1991)的方法,蚊虫饲养条件为温度 26 ± 1℃,光周期 14L: 10D。

1.2 蚊初孵幼虫的获取

将致倦库蚊深桂品系雌蚊 24 h 内产出的 10 余块卵筏置于 75% 酒精中洗刷约 10 min。去酒精后,用无菌水漂洗 3 次,放入盛有无菌水的瓶口略微松开的蓝盖瓶中,置于 28℃ 细胞培养箱[SANYO, MCO-18AIC(UV)]孵育 1 ~ 2 d。

1.3 蚊细胞的原代培养

参考 Mitsuhashi(2002)的方法改进后如下操作。在无菌条件下,用滤纸将刚刚孵化的孑孓转移到加有 1 mL HBSS(Sigma, H6136-1L)的 EP 管中,置于冰上 10 min 后,待孑孓降至管底后,弃多余液体,用维纳斯剪将幼虫剪碎。再用 2 mL 培养基重悬虫体碎片,将其转移至培养瓶(CORNING, 430168)中,置于 28℃ 细胞培养箱(SANYO, MCO-18AIC)内闭瓶培养。培养基以 M199 为基础,添加 20% 胎牛血清使用,具体成分为: 77 mLM199 培养基(Sigma, M0393-1L)、20 mL 灭活胎牛血清(四季青公司)、1 mL 5% 水解乳蛋白(BD)、1 mL 双抗(华北制药)及 1 mL 谷氨酰胺(200 mmol/L, Sigma)。

1.4 蚊细胞的传代培养

取一瓶生长良好的蚊细胞弃掉培养基,用无菌 D-PBS 漂洗 2 次,加入 2 mL 含 0.25% 胰蛋白酶的消化液 28℃ 消化 1 ~ 3 min,弃胰蛋白酶,再消化 1 ~ 3

min 后用 2 mL 含血清的 M199 培养基中止消化，并轻轻吹打，按体积比 1∶1～1∶3传代培养。

1.5 蚊细胞 DNA 扩增指纹图谱（DNA amplification fingerprinting，DAF）

1.5.1 细胞 DNA 的制备：取生长良好的单层贴壁致倦库蚊细胞系细胞和草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* Sf9 细胞系（Invitrogen），参考 1.4 节细胞传代方法，终止消化后，离心去上清。黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* S2 悬浮细胞（中国科学院动物研究所陈大华教授惠赠）则直接离心去上清。计数后取细胞 10^6 个，参考 Mclntosh 等（1996）和 Zhang 等（2006）的方法，用 TBS 缓冲液离心清洗重悬浮细胞，加入 0.5 mL EAP 裂解缓冲液（0.5% SDS，0.25 mol/L EDAT，pH 8.0）。使用前加入蛋白酶 K（100 μg/mL），并使细胞分散充分，于 50℃水浴放置过夜，用等量饱和酚∶氯仿∶异戊醇（25∶24∶1，v/v）抽提 1～2 次，震荡 10 min，12 000 r/min 10 min（Eppendorf 公司，5424R），取上清。再用等体积氯仿∶异戊醇（24∶1，v/v）抽提 1～2 次，震荡，12 000 r/min 10 min，取上清。加 1/2 倍体积的 7.5 mol/L 醋酸铵，混匀后加入 2 倍体积（含醋酸铵体积）的冰冻乙醇，震荡至澄清，静置冰中 10～20 min，12 000 r/min 10 min，上清全部倒出。加入 1 mL 75% 冰乙醇，12 000 r/min 10 min，弃上清，空气中完全干燥 15～20 min。加入 10 μL TE 缓冲液溶解 DNA，并检测 DNA 质量。

1.5.2 蚊总 DNA 制备：致倦库蚊（深桂品系和 Slab 品系）各 4 头（约 5 mg），加 400 μL HBSS 充分研磨，12 000 r/min 离心去上清。加入 200 μL GA 和 20 μL 蛋白酶，56℃水浴 40 min，等待组织消化。消化后按照细胞 DNA 提取步骤提取蚊 DNA 作为对照。

1.5.3 DAF-PCR 反应条件：参考 Mclntosh 等（1996）和 Zhang 等（2006）的方法，引物为缩醛酶引物，cell-f：5′-CCGGAGCAGAAGAAGGAGCT-3′；cell-r：5′-CACATACTGGCAGCGCTTCA-3′。由北京六合华大基因科技有限公司合成。PCR 采用 50 μL 体系：10×LA Taq Buffer Ⅱ（Mg^{2+} Plus）5 μL，2.5 mmol/L dNTP 8 μL，5 U/μL LA Taq 0.5 μL（TaKaRa），上下游引物各 1 μL（20 pmol），模板 DNA 1 μL（70 ng）。PCR 反应条件：94℃变性 2 min；40 个循环（94℃ 1 min，55℃ 1 min，72℃ 1 min），72℃延伸 5 min。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.6 蚊细胞核糖体 DNA（rDNA）内转录间隔区（internal transcribed spacer，ITS）序列鉴定

根据 GenBank 中致倦库蚊 rDNA ITS1 序列 EU359697.1 和 rDNA ITS2 序列 DQ168423 设计 ITS PCR 引物，并由北京六合华大基因科技有限公司合成，其中 ITS1dir：5′-AGGTTCGTCCTATGT-3′；ITS1rev：5′-GAGCGAGCGAGTTCAAAG-3′；ITS2dir：5′-CTCAGCGGCTCGGGGTTT-3′；ITS2rev：5′-TTGGGTTGTTCTGTTCTGTGGA-3′。以 DNA 扩增指纹图谱实验提取致倦库蚊细胞系的 DNA 为模板，使用 LA Taq 酶（TaKaRa）进行 PCR 扩增。94℃预变性 2 min，35 个循环（94℃ 45 s，58℃ 45 s，72℃ 30 s），72℃延伸 5 min。将其 PCR 产物 4 μL 与 1 μL T 载体（Promega）组成 10 μL 连接体系，金属浴 16℃过夜。将 5 μL 连接产物转化到感受态细胞 DH5α 中，涂板挑克隆测序（北京六合华大基因科技有限公司）。将测序所得序列与 GenBank 中的致倦库蚊序列进行比对。

2 结果

2.1 原代细胞的培养

原代培养时，将 16 批蚊卵筏进行培养，部分成功孵化成幼虫，将初孵幼虫剪碎后获到了 11 批细胞培养物。1 d 时，其中 7 批可在显微镜下观察到幼虫的大块碎片在培养基内抽动（图 1：A），这种抽动能持续几天、几周，其中一批碎片培养 60 d 后仍在抽动。5 d 时，观察到其中 5 批碎片的断口处出现小的空泡（图 1：B）。10 d 时，其中 4 批中空泡持续增多增大，并慢慢长出少量细胞（图 1：C）。随着细胞的增加，20 d 时，观察到空泡生长成囊状的细胞球，并继续增大（图 1：D，E）。部分细胞球从幼虫碎片断口处脱落，断口或者脱落的大团细胞囊状物还能不断地生长出新的空泡和细胞球，有的细胞囊状物的直径能超过 3 mm。这些囊状细胞球沿着培养瓶的底部生长，形成小的细胞集落（图 2：A）。小的细胞集落不断变多，细胞集落周围的细胞不断增殖（图 2：B），活性最强的一批培养物 20 d 即已生成大量的空泡和囊状细胞球，其中 1 瓶 30 d，其余培养瓶 50～60 d 即可观察到细胞集落逐渐连成片，并覆盖瓶底的 80% 以上，对其进行传代培养。这些细胞集落不仅是沿着细胞瓶的底部生长，还会向上生长成多层细胞。这些细胞形态各异，有直径约为 10 μm 左右梭状细胞、上皮状细胞、小圆形细胞，和直径约

为 20 μm 大圆形细胞,这些细胞中还夹杂着小囊泡状细胞球或空泡。其余 3 批培养物,30 d 时幼虫碎片停止抽动,发生黑化,细胞增殖缓慢甚至停止,在镜下观察,发现其中部分细胞边缘模糊,细胞内有空泡或者颗粒物,经台盼蓝染色确定其死亡。约 150 d 后,培养状态仍没有明显改善,故放弃培养。

2.2 传代细胞的培养

第 1 次传代时,用 D-PBS 漂洗后,胰蛋白酶消化过程长达 6 ~ 7 min,其细胞结构致密紧贴培养瓶底,部分细胞不耐受胰蛋白酶作用而受损,只有部分细胞完全分散,部分仍然成团状,贴壁后成岛状生长。由于初期分离的细胞较少,1∶1传代后,20 ~ 30 d 可再次传代。第 2 – 4 代时,消化时间为 4 ~ 6 min,可观察到细胞分离变多,分散性较好,4 h 后就能成功贴壁,传代时间渐减至 10 d,分种率为 1∶2。经过 6 个月的培养,细胞逐渐适应胰蛋白酶传代,传代间隔减至 3 ~ 5 d,消化时间为 2 ~ 4 min,分种率为 1∶3,消化后细胞的分散性好,生长旺盛(图 2: C, D)。细胞传至第 6 代后,将部分细胞冻存于液氮罐中,复苏后生长状态良好,可以正常传代。12 个月后成为稳定致倦库蚊初孵幼虫细胞系,命名为 Cxq-1。

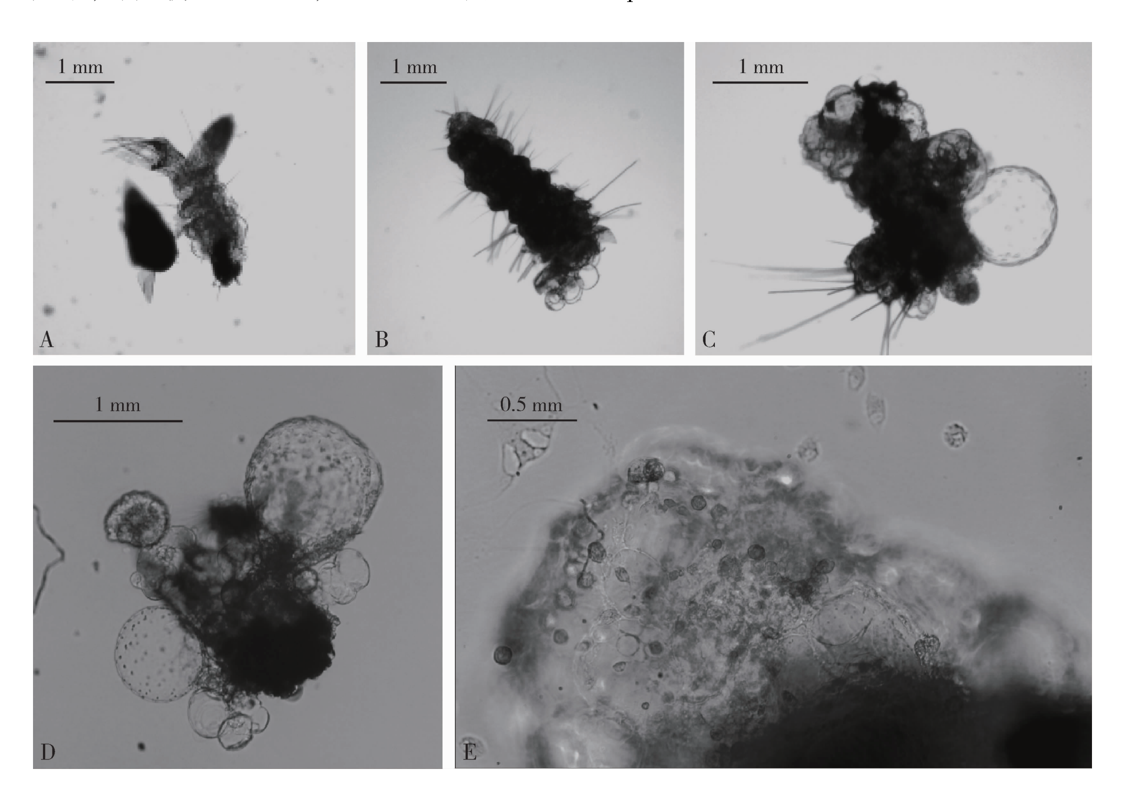


图 1 致倦库蚊幼虫细胞原代培养过程

Fig. 1 Primary cell culture from *Culex pipiens quinquefasciatus* larvae

A: 培养基内蚊幼虫碎片 Larva fragments (1 – 2 d); B: 蚊幼虫碎片断口处长出小空泡 Small vesicles on the fragments (5 – 7 d); C: 蚊幼虫碎片断口处长出大空泡 Large vesicles on the fragments; D: 断口处长出细胞囊状物 Cytocysts on the fragments (14 – 24 d); E: 细胞囊状物 Cytocysts (>30 d).

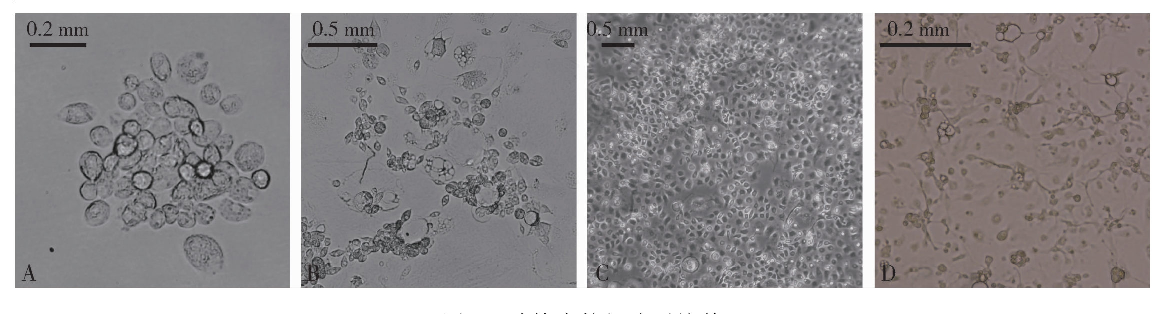


图 2 致倦库蚊细胞系培养

Fig. 2 Cell line culture of *Culex pipiens quinquefasciatus*

A: 小的细胞集落(约 3 周)Small cell colony (about 3 weeks); B: 扩增后的细胞集落(约 3 周)Large cell colony (about 3 weeks); C: 上皮状细胞为优势细胞的单层蚊细胞(约 6 个月)Epithelioid cells (about 6 months); D: 梭状细胞为优势细胞的单层蚊细胞 Fusicellular cells.

2.3　细胞系 DNA 扩增指纹图谱鉴定

如图 3 所示，DAF 技术扩增条带在不同的细胞系间差异较大。样品 M1 和 M2 都来自同一批致倦库蚊深桂品系培育成的细胞系 Cxq-1，但经过多次传代后优势细胞不同，如 M1 的优势细胞为梭状细胞（成纤维细胞状），M2 的优势细胞为上皮状细胞。两个样品虽然优势细胞不同，但是扩增出来的条带有高度一致性。草地贪夜蛾细胞系 Sf9 和黑腹果蝇细胞系 S2 是两种商业昆虫细胞，实验结果显示 M1 和 M2 的条带与 Sf9 和 S2 相比有很好的特异性。样品深桂 1 深桂 2 和 Slab 为来自实验室培养的致倦库蚊不同品系的蚊 DNA 样品，M1 和 M2 与深桂 1、深桂 2 和 Slab 的扩增结果既有较多的重合条带，也有少量的特异条带。综上所述，M1 和 M2 的细胞与其他昆虫商业细胞 DNA 指纹图谱有明显差异，确定为致倦库蚊初孵幼虫来源培育的蚊细胞系。

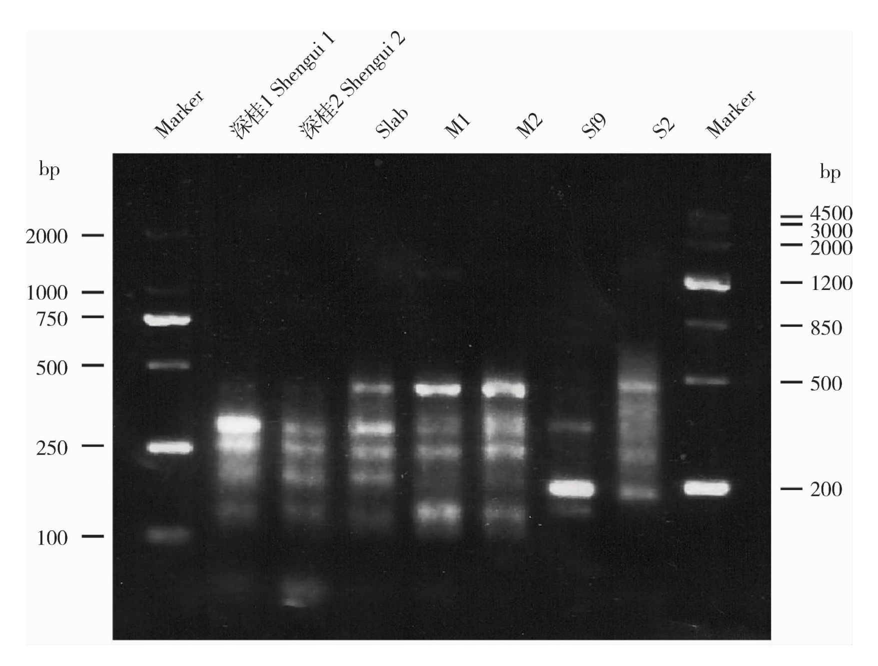


图 3　致倦库蚊细胞系 DNA 扩增指纹图谱

Fig. 3　DNA amplification fingerprinting of *Culex pipiens quinquefasciatus* cell lines

Marker 为 DNA 分子量标准，深桂 1 和深桂 2 为实验室饲养的致倦库蚊深桂品系样品，Slab 为致倦库蚊 Slab 品系样品，M1 为梭状细胞为优势细胞的蚊细胞系 Cxq-1 样品，M2 为上皮状细胞为优势细胞的蚊细胞系 Cxq-1 样品。Sf9 为草地贪夜蛾 Sf9 细胞样品，S2 为黑腹果蝇 S2 细胞样品。Marker is the DNA molecular weight marker. Shengui 1 and Shengui 2 are samples of Shengui strain of *C. pipiens quinquefasciatus*. Slab was the sample of Slab strain of *C. pipiens quinquefasciatus*. M1 is the cell line Cxq-1 containing fusicellular cells. M2 is the cell line Cxq-1 containing epithelioid cells. Sf9 and S2 are cell lines from *Spodoptera frugiperda* and *Drosophila melanogaster*, respectively.

2.4　致倦库蚊细胞核糖体 DNA 内转录间隔区序列鉴定

如图 4（A）所示，M-its1 为测序所得的细胞系 Cxp-1 的 rDNA-ITS1 片段，长为 150 bp，比对后发现这段序列与 GenBank 中致倦库蚊 rDNA-ITS1 序列（EU359697.1）的 382 – 531 bp 的序列完全相同。如图 4（B）所示，M-its2 为测序所得的细胞系 Cxp-1 的 rDNA-ITS2 片段，长为 209 bp，与 GenBank 中致倦库蚊 rDNA-ITS2 序列（DQ168423）81 – 286 bp 有 99% 一致性。上述结果说明细胞系 Cxp-1 确实为致倦库蚊细胞系。

3　讨论

在原代培养的初期，大量活性良好的组织块是后续细胞培养成功的关键。根据实验观察，在蚊卵消毒时间过长或者使用了毒性物质，如加入 $HgCl_2$ 或 NaClO（蓝明扬和赵郁光，1991），会对组织活性造成影响，如产生大量细小的碎片，或者组织块在较短时间内黑化，极大地影响了后期细胞的产生和生长，如果消毒时间或强度不够，又极容易带入污染。经过大量尝试我们采用 75% 乙醇浸泡分散轻轻洗刷 10 min 以达到最佳效果，卵块孵化率高且整齐。初孵幼虫组织块剪碎程度合适也非常重要，太碎或太大都会污染培养基。根据实验摸索，最佳条件是一头幼虫剪碎成 3 ~ 6 块，放入培养瓶后观察，培养基清澈透明度高，培养基内分布较大量的幼虫碎片（约 100 块/瓶），碎片周围没有太多的杂质或细小碎片，可以观察到幼虫碎片在培养基内抽动，这种抽

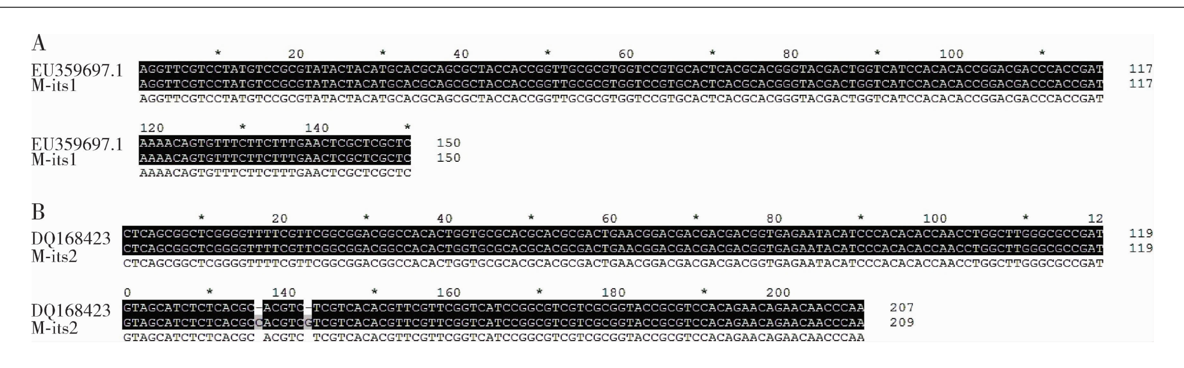


图 4 细胞系 Cxq-1 的 rDNA-ITS1 和 rDNA-ITS2 序列与 GenBank 中致倦库蚊的相应核酸序列的比对

Fig. 4 Sequence alignments of rDNA-ITS1 and rDNA-ITS2 of the cell line Cxq-1 with those of *Culex pipiens quinquefasciatus* registered in the GenBank

A：rDNA-ITS1 序列比对。M-its1 为 Cxq-1 的序列；EU359697.1 为 GenBank 序列。Alignment of the rDNA-ITS1 sequences. M-its1 is from Cxq-1, and EU359697.1 from the GenBank. B：rDNA-ITS2 序列比对。M-its2 为 Cxq-1 的序列；DQ168423 为 GenBank 序列。Alignment of the rDNA-ITS2 sequences. M-its2 is from Cxq-1, and DQ168423 from the GenBank.

动能持续几个月的时间，这样的碎片能持续不断地在断口处长出囊状的细胞球，这是后续快速且大量产生优质细胞的保证，很多利用初孵幼虫成功建系的报道都提及过这点(潘李珍等，1980；蓝明扬和赵郁光，1991)。

在细胞原代培养和传代培养的初期，有很多方法可以提高建立细胞系的成功率。如本研究在原代培养的初期，用血清浸润培养瓶的底部，可以促进幼虫组织的贴壁和其细胞的贴壁游离生长。另外，将血清含量提高到 20% 也可以促进细胞的生长。在原代细胞初期，由于组织块和细胞较少，只用少量如 1 ~ 2 mL 完全培养基培养蚊幼虫碎片，液面只需要能完全覆盖组织块即可，这样有利于组织分泌的促进细胞生长的物质的富集，更好地促进细胞生长。同样的道理，在原代培养和传代培养的初期，换液时保留旧的培养基，因为这些培养基里促生长的物质很丰富而且含有大量悬浮未贴壁的细胞、组织块、细胞泡或者囊状细胞球。将这些培养基加入新的培养瓶中可以继续培养，或者将少量的旧培养基过滤后加入传代初期的细胞内，促进其贴壁和生长。

与许多报道一致，在蚊细胞培养的过程中，原代生成的蚊细胞混杂了各种形态类型的细胞(蓝明扬和赵郁光，1991；Hoshino *et al.*，2015)。本研究观察到有些体积较小，像梭状细胞、上皮状细胞、小圆形细胞(有直径约为 10 μm 左右)和有的体积略大的大圆形细胞(直径约为 20 μm)，这些不同的细胞可能来源于初孵幼虫的不同组织。随着细胞不断培养和传代，细胞的形态和种类趋于类似，优势细胞所占比例不断增加。但是同一批细胞中，不同培养瓶中优势细胞可能不同，如细胞系 Cxp-1 培养 10 个月后在进行后续细胞鉴定实验中，发现不同培养瓶有梭状细胞(成纤维状)和上皮状细胞为优势细胞。这种现象在昆虫细胞培养过程中较为普遍，开始时由不同组织产生的混合多样细胞类型，多次培养后发展分化成上皮状细胞和成纤维状细胞(Bello *et al.*，2001；Athawale *et al.*，2002；Sudeep *et al.*，2009；Segura *et al.*，2012)。这可能是因为多次传代不断选择生长最快的一群细胞，其他类型的细胞在多次传代中逐渐消失(张寰等，2007)。

细胞系的鉴定重要部分就是鉴定细胞系的组织来源。蚊细胞系的扩增条带和它的来源昆虫的条带基本重合但略有差异，在 Mclntosh 的研究中 4 株鳞翅目细胞及其来源和 1 株蚊细胞系及其来源都出现了同样的现象，即细胞系与组织来源相比出现了额外的条带，可能是异倍体导致了这种现象的发生(Mclntosh *et al.*，1996)。也可能是在传代过程中，细胞不断地被选择和淘汰，它们的基因组发生了共同变化，某些特定的基因如与传代相关的基因保存下来，或者某些特定的基因丢失。

蚊细胞系在许多研究领域体现出其重要的研究和应用价值。利用蚊细胞培养技术，可获得大量、纯一的蚊细胞材料来代替蚊虫样品进行研究，从而减少科研成本。蚊细胞为蚊虫的细胞学、遗传学和分子生物学提供了良好的研究材料。比如利用蚊细胞系可以进行疟原虫、丝虫在蚊体发育情况的观察，测定对各种病毒的敏感性，进行病毒分离和临床诊断(蓝明扬和赵郁光，1991)以及病毒-蚊寄主互作研究，例如 C6/36 白纹伊蚊 *Aedes albopictus* 细胞系已被用于证实登革热病毒进入细胞的机制(Acosta *et al.*，2011)。因为蚊细胞对病毒的敏感性具有一定

的广谱性,故可为多种疫苗的制备提供条件(蓝明扬和赵郁光, 1991)。蚊细胞还可以用来确定新型化合物如杀虫剂或生物防治剂的功效,鉴定新的化合物是否对蚊细胞系致死,而对其他昆虫或者人细胞系不产生或者产生少量的影响(Walker *et al.*, 2014)。

参考文献(References)

Acosta EG, Castilla V, Damonte EB, 2011. Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells. *Virus Res.*, 160(1-2): 173-179.

Athawale SS, Sudeep AB, Barde PV, Jadi R, Pant U, Mishra AC, Mourya DT, 2002. A new cell line from the embryonic tissues of *Culex tritaeniorhynchus* and its susceptibility to certain flaviviruses. *Acta Virol.*, 46(4): 237-240.

Bello FJ, Brochero H, Boshell J, Olano V, Rey G, 1997. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 92(1): 123-128.

Bello FJ, Rodríguez JA, Escovar J, Olano VA, Morales A, González M, Rey G, 2001. A new continuous cell line from the mosquito *Psorophora confinnis* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infections with some arboviruses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 96(6): 865-873.

Charpentier G, Belloncik S, Ducros G, Fontenille D, Tian L, Quiot JM, 1995. Establishment and characterization of three cell lines from *Aedes triseriatus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 32(6): 793-800.

Grace TD, 1966. Establishment of a line of mosquito (*Aedes aegypti* L.) cells grown *in vitro*. *Nature*, 211(5047): 366-367.

Hoshino K, Isawa H, Kuwata R, Tajima S, Takasaki T, Iwabuchi K, Sawabe K, Kobayashi M, Sasaki T, 2015. Establishment and characterization of two new cell lines from the mosquito *Armigeres subalbatus* (Coquillett) (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 51(7): 672-679.

Hsu SH, Mao WH, Cross JH, 1970. Establishment of a line of cells derived from ovarian tissue of *Culex quinquefasciatus* Say. *J. Med. Entomol.*, 7(6): 703-707.

Hsu SH, Li SY, Cross JH, 1972. A cell line derived from ovarian tissue of *Culex tritaeniorhynchus* summorosus Dyar. *J. Med. Entomol.*, 9(1): 86-91.

Kitamura S, 1970. Establishment of cell line from *Culex* mosquito. *Kobe J. Med. Sci.*, 16(1): 41-50.

Kuwata R, Hoshino K, Isawa H, Tsuda Y, Tajima S, Sasaki T, Takasaki T, Kobayashi M, Sawabe K, 2012. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 48(6): 369-376.

Lan MY, Zhao YG, 1991. Mosquito Cell Culture and Application. Atomic Energy Press, Beijing. 239 pp. [蓝明扬, 赵郁光, 1991. 蚊细胞培养及应用技术. 北京: 原子能出版社. 239 页]

McIntosh AH, Grasela JJ, Matteri RL, 1996. Identification of insect cell lines by DNA amplification fingerprinting (DAF). *Insect Mol. Biol.*, 5(3): 187-195.

Mitsuhashi J, 2002. Invertebrate Tissue Culture Methods. Springer Japan Press, Tokyo. 75-77.

Oelofsen MJ, Gericke A, Smith MS, van der Linde TC, 1990. Establishment and characterization of a cell line from the mosquito *Culex* (*Culex*) *theileri* (Diptera: Culicidae) and its susceptibility to infection with arboviruses. *J. Med. Entomol.*, 27(6): 939-944.

Pan LZ, Kong DF, Wang FY, Shi MH, 1980. Establishment and characterization of cell lines of *Aedes albopictus*. *J. Beijing Second Med. Coll.*, (1): 10-18. [潘李珍, 孔德芳, 王凤芸, 石梦辉, 1980. 白纹伊蚊(*Aedes albopictus*)细胞株的建立及其特征. 北京第二医学院学报, (1): 10-18]

Segura NA, Santamaría E, Cabrera OL, Bello F, 2012. Establishment and characterisation of a new cell line derived from *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 107(1): 89-95.

Song SW, Zhao TY, Jiang SN, Lu BL, 2003. The sequencing and sequences analyses of rDNA-ITS2 of *Culex pipiens* complex in China. *Acta Parasitol. Med. Entomol. Sin.*, 10(2): 74-82. [宋社吾, 赵彤言, 蒋书楠, 陆宝麟, 2003. 我国尖音库蚊复合组蚊虫核糖体 DNA 第 2 内转录间隔区序列测定与分析. 寄生虫与医学昆虫学报, 10(2): 74-82]

Sudeep AB, Parashar D, Jadi RS, Basu A, Mokashi C, Arankalle VA, Mishra AC, 2009. Establishment and characterization of a new *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) cell line with special emphasis on virus susceptibility. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 45(9): 491-495.

Turell MJ, 2012. Members of the *Culex pipiens* complex as vectors of viruses. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, 28(4s): 123-126.

Walker T, Jeffries CL, Mansfield KL, Johnson N, 2014. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral transmission in the United Kingdom. *Parasit. Vector.*, 7: 382.

Yan L, Pan LZ, Zhang Y, Chen PH, 1989. The establishment and characterization of a cell lines (CT-188) from larvae of *Culex tritaeniorhynchus*. *J. Capital Inst. Med.*, 10(4): 289-293. [颜林, 潘李珍, 张漪, 陈佩惠, 1989. 三带喙库蚊细胞系的建立及其特征研究. 首都医学院学报, 10(4): 289-293]

Zhang H, Zhang YA, Qin Q, Li X, Miao L, Wang Y, Yang Z, Ding C, 2006. New cell lines from larval fat bodies of *Spodoptera exigua*: characterization and susceptibility to baculoviruses (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.*, 91(1): 9-12.

Zhang H, Zhang YA, Qin QL, Wang YZ, Qu LJ, Li X, Miao L, Yin ZX, Zhang AJ, Wen FY, 2007. Advances in establishment of insect cell lines. *Acta Entomol. Sin.*, 50(8): 834-839. [张寰, 张永安, 秦启联, 王玉珠, 曲良建, 李瑄, 苗麟, 殷珍仙, 张爱君, 温发园, 2007. 昆虫细胞系的培养和建立技术. 昆虫学报, 50(8): 834-839]

(责任编辑: 马丽萍)